

# プロスタノイドの産生と糖尿病の病態との関連性に関する研究

著者	村井 ユリ子
号	431
発行年	2000
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15654">http://hdl.handle.net/10097/15654</a>

氏 名 (本籍)                    <sup>むら</sup>村            <sup>い</sup>井            <sup>ゆ</sup>ユ    <sup>り</sup>リ    <sup>こ</sup>子

学 位 の 種 類                    博                    士 (薬            学)

学 位 記 番 号                    薬                    第            4 3 1            号

学位授与年月日                    平 成 12 年 11 月 22 日

学位授与の要件                    学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目                    プロスタノイドの産生と糖尿病の病態との関連性  
に関する研究

論文審査委員                    (主 査)  
教授 水 柿 道 直                    教授 大 内 和 雄

教授 中 畑 則 道

# 論文内容要旨

## 【目的】

種々のプロスタノイドは細胞膜リン脂質中に含まれる高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸等から生成し、それぞれ局所ホルモンとして多彩な生理作用を発現する。プロスタノイドのひとつであるプロスタサイクリン ( $\text{PGI}_2$ ) は、主に血管内皮細胞でシクロオキシゲナーゼ (COX) を介して産生され、強力な血小板凝集抑制及び血管拡張作用を示す。それに対し、主に血小板で COX を介して産生されるプロスタノイドのトロンボキサン  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) は、 $\text{PGI}_2$  と相反する作用を示す。これらの産生バランスが調節されることにより血管系の恒常性が維持されている。さらに、プロスタノイドは多くの疾患の発症や進行と密接に関連するものと考えられる。例えば糖尿病患者では、慢性的な高血糖状態の結果、網膜血管閉塞症や腎症などの末梢血管障害を併発することが多い。これらの病態において血液凝固能の亢進が観察されることから、 $\text{TXA}_2$  と  $\text{PGI}_2$  の産生バランスの不均衡の関与が示唆されるが、詳細は明らかにされていない。一方、近年 COX を介さず生成するイソプロスタンと呼ばれる一群のプロスタノイドの存在が注目されるようになってきた。8-epi-prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  (8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) は、体内に最も豊富に存在するイソプロスタンのひとつであり、細胞膜リン脂質中のアラキドン酸から、非酵素的にフリーラジカルが関与した過酸化によって生じることから、全身性の酸化ストレスのマーカーとして、血栓性疾患の病態とも密接な関係にあることが示唆されている。

各種病態におけるこれらのプロスタノイドの挙動と役割について解明するためには、産生量の把握が不可欠である。

そこで本研究では、現代の国民病とも言われ、病態の進行とともに極端な Quality of life の低下が懸念される糖尿病について、臨床における早期診断、治療及び予防に資する目的で、プロスタノイドの産生量と糖尿病との関連性を明らかにするために以下の研究を行った。

まず血管系に対し相反する作用をもつ  $\text{TXA}_2$  及び  $\text{PGI}_2$  の産生と糖尿病の病態との関連性を定量的に追求した。次に 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  の産生量について定量的な解析を行った。現在、8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  は放射免疫測定法や酵素免疫測定法、GC/MS 法で測定されることが多いが、これらの方法では放射性物質取扱施設や煩雑な誘導体化が必要であることなどが臨床応用を考える場合に不利である。そこで、臨床応用を目的として新たに液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS-MS) 法による迅速・簡便な 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  微量定量法を確立し、この方法を用いて尿試料中の 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  含量を測定し、糖尿病の病態との関連性を検討した。

## 【方法】

$\text{TXA}_2$  及び  $\text{PGI}_2$  の産生は局所的で微量であり、かつ活性体の半減期が短いため、活性体の量を直接測定することは困難である。そのため、水柿らによって確立された方法を用い、 $\text{TXA}_2$  と  $\text{PGI}_2$  の産生の指標としてそれぞれの尿中安定代謝産物である 11-dehydro- $\text{TXB}_2$ 、2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  の定量を行った。2,3-dinor-6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  は、尿試料に内部標準物質 (IS) として重水素標識体を添加し、酸性条件下、

AccubondC18及びシリカゲルカラムによる精製を行い、メチルエステル (ME)-メトキシム (MO)-ジメチルイソプロピルシリル (DMIPS) エーテル誘導体に導いた。 $[M-43]^+$ イオンをモニタリングイオンとしてガスクロマトグラフィー／セレクトッドイオンモニタリング (GS/SIM) 法を実施し、ISとのピーク面積比を用いて定量した。11-dehydro-TXB<sub>2</sub>はME-プロピルアミド (PA)-DMIPS エーテル誘導体に導き、同様の方法により定量した。これらの値を用いて、両化合物の定量値の比であるTX/PGIを求め、この値の変化と糖尿病の病態との関連を検討した。

次に8-epi-PGF<sub>2</sub>αの微量定量法の検討には、LC/MS-MS装置としてNanospace SI-1 LC system (資生堂), Quattro II タンデム質量分析計 (Micromass) を用いた。カラムはC18 Capcell Pak UG120 (資生堂), 移動相はアセトニトリル-水-酢酸 (30:70:0.02, v/v), 流速100 μL/min, カラム温度は40℃とした。イオン化法には負イオン検出エレクトロスプレー法を用いた。Collision gas (Ar) 圧 $2.0 \times 10^{-3}$  mBar, capillary voltage 3,000 V, cone voltage 40 V, collision energy 25 eV, イオン源温度160℃で測定した。尿中の8-epi-PGF<sub>2</sub>αは、ISとして $[^2H_4]$  8-epi-PGF<sub>2</sub>α (Cayman) を添加し、Empore C18 HD disk cartridge (3M) を用いて固相抽出法により精製した後、LC/MS-MSに付した。

#### 【結果及び考察】

(1)～(3)項に示すように、TX/PGIの値は、糖尿病及びその合併症となる網膜血管閉塞症 (RVO) 並びに慢性腎炎の病態の変化に伴って変動することが明らかになり、TX/PGIが従来の指標とは異なる血栓性の病態の新たな指標として、糖尿病の発症及び合併症や治療効果のモニタリングに有用であることが明らかになった。(1)2型糖尿病患者 (n = 38) では、健常人に比べてTXA<sub>2</sub>産生の亢進が認められた。そのTX/PGIの値は $79 \pm 69$  (平均値±SD) であり健常人の $20 \pm 14$ に比べ有意に高く ( $p < 0.05$ ), 血栓形成傾向を示すことが明らかになった。また、TX/PGIとHbA<sub>1c</sub>値及びトリグリセリド値との間にそれぞれ弱い正の相関関係が認められた。血糖値130 mg/dL以上の血糖コントロールが十分でない患者では、血糖値とTX/PGIとの間に強い相関性が認められ、病状の進展と共にTX/PGIの上昇が示唆された。さらに比較的軽症でもTX/PGIの変化が生じている例があり、TX/PGIの上昇は糖尿病発症の早期に生じていることが考えられた。そこで治療薬剤の影響がなく糖尿病の発症及び進行をよく反映していると考えられるモデル動物で検討を行った。その結果、streptozotocinで糖尿病を誘発したICRマウスでは、正常なマウスと比較してTX/PGIは高値を示し、自然発症性糖尿病マウスのdb/dbマウスでは、経日的なTX/PGIの上昇が認められたこと、TX/PGIは血糖値、HbA<sub>1c</sub>、トリグリセリドの上昇及び血中インスリンの減少に対して相関が認められたことから、糖尿病の進行とTX/PGIの間に関連性があることが明らかになり、糖尿病患者における結果が裏付けられた。(2)RVO患者では健常人と比較するとTXA<sub>2</sub>の産生亢進に伴いTX/PGIが有意に高い値を示したことから、RVO患者では血小板凝集能が亢進して血栓を形成し易い状態にあることが明らかになり、TX/PGIがRVOの病態変化の指標になることが明らかになった。さらにアスピリン低用量療法によりRVO患者のTX/PGIが健常レベルに回復することから、本療法の有効性が明らかにされた。(3)慢性糸球体腎炎 (CGN) 患者では健常人に比べTX/PGIが高い値を示した。またTX/PGIの高さと腎生検による活動性の所見はよく一致していたことから、進展した腎炎では病変部の血小板が活性化しており、TXA<sub>2</sub>の

産生が亢進して、尿中TX/PGIが高値を示すものと考えられた。そこで経時的な検討を行ったところ、治療開始時はTXA<sub>2</sub>の産生が亢進しているが、治療に伴い尿蛋白や尿潜血が減少すると、TX/PGIも健常レベルに低下することが明らかになった。

次にLC/MS-MS法による8-epi-PGF<sub>2</sub>α微量定量法を確立した。MS1のマスペクトルにはm/z 353と357にそれぞれ8-epi-PGF<sub>2</sub>αとISの[M-H]<sup>-</sup>のピークが観察された。MS2におけるそれぞれのプロダクトイオンm/z 193とm/z 197をモニタリングイオンとするselected reaction monitoring (SRM)に付し、検量線を作成すると0.04-10 ngの範囲で良好な直線性が得られた(r=0.997)。添加回収率は96.8～104.9%であった。尿検体からの精製にEmporeカートリッジカラムによる固相抽出法とLC/MS-MSによる分析を組み合わせることにより、従来法に比べ非常に迅速・簡便で、しかもGC/MSと同程度に高感度かつ精度の高い8-epi-PGF<sub>2</sub>αの定量が可能となった。この方法を用いて健常人及び糖尿病患者の尿中8-epi-PGF<sub>2</sub>αの定量を行ったところ、健常人(女性5人、男性8人、31±7.4才)は、429.4±149.6 pg/mg creatinineであるのに対し2型糖尿病の患者7人(女性2人、男性5人、40±13.6才)では630.9±275.6 pg/mg creatinineで健常人に比べて有意に高く(p<0.05)、酸化ストレスが大きい状態にあることが明らかになった。本法は、迅速・簡便で患者への負荷も少なく、8-epi-PGF<sub>2</sub>αと糖尿病の病態との関連性の解析や薬物治療のモニター等に利用できる可能性が示された。

以上より、糖尿病においてはCOXの働きにより生成するTXA<sub>2</sub>とPGI<sub>2</sub>の産生比TX/PGIと、COXを介さずに生成する8-epi-PGF<sub>2</sub>αの産生量とがいずれも健常人に比べて増加していた。糖尿病の進行とともにプロスタノイドの産生が変化しており、病態の変化とプロスタノイドとが密接な関係にあることが示唆された。血液に比べて検体採取時の侵襲が少ない利点を有する尿を用い、合併症の差異等の病態の変化と、これらのプロスタノイドの質的並びに量的な動態とを多角的に解析することによって、血液凝固能や酸化ストレスと糖尿病の発症並びに進行との関連性の詳細を明らかにし、診断、治療のモニタリング、さらには予防等に应用することが望まれる。

## 審査結果の要旨

アラキドン酸等から生成するプロスタノイドは、それぞれ局所ホルモンとして多様で強力な生理作用を有するため、疾患の発症や進行と密接に関連するものと考えられているが、発現量が超微量で不安定であるためその定量的解析は困難とされてきた。本研究ではこれらプロスタノイドの産生量を、感度と化合物選択性に優れる質量分析法を駆使して解析し、糖尿病における産生意義についての検討を行い、以下の成果を得た。

強力な血小板凝集及び血管収縮作用を有するトロンボキサン $A_2$  (TXA $_2$ ) と、相反する作用を有するプロスタサイクリン (PGI $_2$ ) 産生比 (TX/PGI 比) を、その尿中安定代謝体を指標とするガククロマトグラフィー／質量分析 (GC/MS) 法を用いたマススクリーニングにより検討し、病態マーカーとの関連性を比較した。その結果、病態の変化に伴って TXA $_2$  の産生亢進と TX/PGI 比の上昇が認められ、血栓形成傾向を示すことが判明した。次に、治療薬剤の影響がなく糖尿病の発症及び進行をよく反映する糖尿病モデルマウスにおいても、同様の結果が得られることを明らかにした。さらに、糖尿病及びその合併症として知られる網膜血管閉塞症 (RVO) 並びに慢性腎炎患者においても TX/PGI 比の上昇が認められ、RVO においては低用量アスピリン療法により TX/PGI 比が健常人レベルに減少し、寛解例も認められた。以上の結果から、TX/PGI が血栓性の病態の新たな指標として糖尿病の発症及び合併症や治療効果のモニタリングに有用であることを示した。

次に、アラキドン酸から非酵素的にフリーラジカルが関与した過酸化によって産生され、全身性の酸化ストレスの指標と考えられる 8-epi-prostaglandin F $_2\alpha$  (8-epi-PGF $_2\alpha$ ) 産生量の定量的解析を可能とするため、簡便かつ高感度の液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 (LC/MS-MS) 法による尿中 8-epi-PGF $_2\alpha$  微量定量法を新規に確立した。本法を用いて糖尿病患者尿中の 8-epi-PGF $_2\alpha$  産生量を検討した結果、健常人に比して有意に高い産生量が認められ、糖尿病患者は酸化ストレスが大きい状態にあることを明らかにした。本法は、迅速・簡便で患者への負荷も少なく、8-epi-PGF $_2\alpha$  と糖尿病の病態との関連性の解析や薬物治療のモニター等に応用が期待される。

以上、本研究は、糖尿病においては TXA $_2$  と PGI $_2$  の産生比 TX/PGI と、8-epi-PGF $_2\alpha$  の産生がいずれも健常人に比べて亢進し、病態の変化とこれらプロスタノイドとの関連性を定量的に明らかにした。また、本研究で開発した尿中化合物の定量法は、血液に比べて検体採取時の侵襲が少ない利点を有するため、臨床への応用性も高い。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。